

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08084589 A**(43) Date of publication of application: **02.04.96**

(51) Int. Cl.

C12N 15/09
// C12N 5/10
(21) Application number: **06251312**(22) Date of filing: **19.09.94**(71) Applicant: **SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD**(72) Inventor: **SAITO IZUMI**
KANEGAE HIROMI
(54) RECOMBINED DNA VIRUS VECTOR FOR
INFECTION OF ANIMAL CELL
(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the recombinant DNA virus vector capable of introducing a foreign gene into an animal cell in the form capable of being autonomously replicated in a wide range of animal cells.

CONSTITUTION: The recombinant DNA virus vector for infecting the animal cell has a promoter, a recombinase gene and a poly A sequence. The recombinant DNA virus vector for injecting the animal cell has two recombinase-recognizing sequences and a replication point-starting point acting on the animal cell, the promoter, the foreign gene and the poly A sequence placed between the two recombinase-recognizing sequences. The method for introducing the foreign gene into the cell comprises infecting the animal cell with the recombinant DNA virus vector and subsequently autonomously replicating a foreign gene-expressing unit

in the cell. And a method for genetically treating a genetic disease comprises introducing a human gene into the cell by the method for introducing the gene into the cell. The recombinant DNA virus vector is useful for the therapy of the genetic diseases.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-84589

(43) 公開日 平成8年(1996) 4月2日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
# C 1 2 N 5/10		9281-4B 7729-4B	C 1 2 N 15/ 00 5/ 00	Z N A A B
審査請求 未請求 請求項の数14 F D (全 12 頁)				

(21) 出願番号 特願平6-251312

(22) 出願日 平成6年(1994) 9月19日

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者

斎藤 泉

東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号

(72) 発明者

鎌ヶ江 裕美

東京都品川区西五反田8丁目10番14-1405号

(74) 代理人

弁理士 細田 芳徳

(54) 【発明の名称】 動物細胞感染用の組換えDNAウイルスベクター

(57) 【要約】

【構成】プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する動物細胞感染用の組換えDNAウイルスベクター、二つのリコンビナーゼ認識配列並びにその間に動物細胞で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列を有する動物細胞感染用の組換えDNAウイルスベクター、これらの組換えDNAウイルスベクターを動物細胞に感染させ、外来遺伝子発現ユニットを細胞内で自律複製させることによる外来遺伝子の細胞内導入法、及びこの細胞内導入法を用いてヒト遺伝子を細胞内に導入することの特徴とする遺伝子治療法。

【効果】本発明により、広範な動物細胞において自律複製可能な形で外来遺伝子を動物細胞に導入することができる組換えDNAウイルスベクターを提供することができる。本発明の組換えDNAウイルスベクターは遺伝病の治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリ A 配列を有する動物細胞感染用の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 2】 DNA ウイルスペクターがアデノウイルスペクターである請求項 1 記載の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 3】 リコンビナーゼ遺伝子が太陽菌 P1 ファージ由来のリコンビナーゼ Cre の遺伝子である請求項 2 記載の DNA ウイルスペクター。

【請求項 4】 二つのリコンビナーゼ認識配列並びにその間に動物細胞で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリ A 配列を有する動物細胞感染用の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 5】 DNA ウイルスペクターがアデノウイルスペクターである請求項 4 記載の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 6】 動物細胞で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリ A 配列が上流からこの順に配向している請求項 5 記載の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 7】 外来遺伝子、ポリ A 配列、動物細胞で働く複製起点およびプロモーターが上流からこの順に配向している請求項 5 記載の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 8】 リコンビナーゼ認識配列がリコンビナーゼ Cre の基質となる loxP の DNA 配列である請求項 4 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 9】 動物細胞で働く複製起点がウイルス由来又は動物細胞由来のものである請求項 4 から請求項 8 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 10】 動物細胞で働く複製起点がパルボウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ボックスウイルス、及びパルボウイルス由来のものからなる群より選ばれるものである請求項 9 記載の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 11】 プロモーターおよびポリ A が、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニフトリ β-アクトチンプロモーター、ウサギ β グロブリンのスーパーライジングアセプターおよびポリ A 配列からなるハイブリッドプロモーター (CAG プロモーター) である請求項 1~請求項 10 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA ウイルスペクター。

【請求項 12】 プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリ A 配列を有する動物細胞感染用の組換え DNA ウイルスペクター、並びに二つのリコンビナーゼ認識配列及びその間に動物細胞で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリ A 配列を有する動物細胞感染用の組換え DNA ウイルスペクターを動物細胞に感染さ

せ、二つのリコンビナーゼ認識配列間に存する動物細胞で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリ A 配列を環状分子として切り出し、細胞内で自律複製させることによる外来遺伝子の細胞内導入法。

【請求項 13】 DNA ウイルスペクターがいずれもアデノウイルスペクターである請求項 12 に記載の外来遺伝子の細胞内導入法。

【請求項 14】 遺伝子治療に際して、請求項 12 又は 13 記載の細胞内導入法を用いることを特徴とするヒト遺伝子の細胞内導入法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は動物細胞感染用の組換え DNA ウイルスペクターに関する。さらに詳しくは、リコンビナーゼ遺伝子またはこのリコンビナーゼの認識配列をコードする DNA 配列を含む組換え DNA ウイルスペクターと、該ペクターを用いた外来遺伝子の細胞内導入法及び遺伝子治療への使用に関する。

【0002】

【従来の技術・発明が解決しようとする課題】 これまで遺伝子導入のウイルスペクターとしてレトロウイルスが良く用いられたが、このウイルスは分裂している細胞にしか導入できないことや宿主細胞の染色体に組み込まれてしまうことにより、特に遺伝子治療においてはその安全性の観点より問題があり、その応用範囲は限られていると考えられている。アデノウイルスペクターは、種々の動物培養細胞で 100% 近い導入効率を示すこと、またレトロウイルスと異なり積極的な染色体組み込みの機構を持たないこと、さらに、休止期の細胞でも遺伝子導入出来るという利点もあり、外来遺伝子導入実験のペクターとしての応用範囲は極めて広く、近い将来は遺伝子治療の主要技術の一つとして確立するであろうと考えられている。

【0003】 アデノウイルスペクターの利用は遺伝子治療技術の一つとして、また神経系などの高度に分化した細胞での発現研究の面で急速に普及してきている。遺伝子治療技術としては、既に精巣等々機能している組織へ直接投与することにより機能を担っている生細胞へ直接欠損した遺伝子を補う、いわゆる in vivo 遺伝子治療の方法として研究が精力的に進められている。既に囊性繊維症では、米国で 5 グループが実際に患者への実験治療を認められており、筋ジストロフィー症、家族性高コレステロール血症、また脳腫瘍等に対して活発に研究されるようになった。一方でアデノウイルスペクターは休止期の細胞へも遺伝子導入が可能であり、分化した細胞や、特に神経系への遺伝子導入方法として、初代培養や動物個体への遺伝子導入実験が注目されている。以上より、アデノウイルスペクターは、神経系を含む多くの分化、未分化細胞への遺伝子治療導入だけでなく、動物個体への直接注入・投与による遺伝子発現が可能であるこ

3

とから、特に遺伝子治療への応用が期待されている。

【0004】しかし、アデノウイルスはレトロウイルスと異なり、積極的な染色体組み込みの機構を持たないことから、発現が一時的である。その期間は1〜2週間から、長くても2ヶ月程度である。そのため治療効果を継続させる必要がある場合には、繰り返し投与による発現の継続が必要である。しかし、繰り返し投与では抗体の出現による治療効果の低減が懸念される。従って、本発明の目的は、アデノウイルスベクターによって動物細胞内に導入された外来遺伝子が、細胞内で自律複製可能な形に変換し得るような組換えアデノウイルスベクターの系を構築することであり、さらに、かかる系を遺伝子治療に提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは、上記の問題を解決するために鋭意検討し、動物細胞感染用のDNAウイルスベクターとして、アデノウイルスベクターを用いて細胞内に導入した外来遺伝子を含む遺伝子発現ユニットを、リコンビナゼおよびその認識配列を利用することにより環状分子化するとともに、そこに複製起点を付与することにより、アデノウイルスベクターを用いて細胞内に導入した外来遺伝子を含む遺伝子発現ユニットを、自律複製可能な形に変換することに成功した。

【0006】ここに、リコンビナゼとは、特異的なDNA組換え酵素で、数十塩基からなる特異的なDNA配列を認識し、この配列間でDNAの切斷・鎖の交換と結合の全工程を行う。そこで、この酵素を発現する組換えアデノウイルスベクターと、この認識配列を同じ向きに2コピーを持つ組換えアデノウイルスベクターを複製し、両方を細胞に共感染させると、発現したリコンビナゼにより2つの認識配列間の再構成が起き、挟まれた部分が環状分子として切り出される。従って、この部分に発現ユニットと複製起点を組み込んでおけば、環状分子は核内で複製され、細胞内において永続的に維持され、外来遺伝子の発現を続けることができる。従って、このような組換えアデノウイルスベクターの系を遺伝子治療に使用すれば、1回投与により、長期間の治療効果を持続させることが可能となる。本発明は、かかる知見に基づいて、さらに研究を進めて完成するに至ったものである。

【0007】即ち、本発明の要旨は、(1) プロモーター、リコンビナゼ遺伝子およびポリA配列を有する動物細胞感染用の組換えDNAウイルスベクター、

(2) DNAウイルスベクターがアデノウイルスベクターである前記(1)記載の組換えDNAウイルスベクター、(3) リコンビナゼ遺伝子が犬腸菌P1ファージ由来のリコンビナゼCreの遺伝子である前記(2)記載のDNAウイルスベクター、(4) 二つのリコンビナゼ認識配列並びにその間に動物細胞で働く

4

複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列を有する動物細胞感染用の組換えDNAウイルスベクター、(5) DNAウイルスベクターがアデノウイルスベクターである前記(4)記載の組換えDNAウイルスベクター、(6) 動物細胞で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列が上流からこの順に配向している前記(5)記載の組換えDNAウイルスベクター、(7) 外来遺伝子、ポリA配列、動物細胞で働く複製起点およびプロモーターが上流からこの順に配向している前記(5)記載の組換えDNAウイルスベクター、(8) リコンビナゼ認識配列がリコンビナゼCreの基質となるloxPのDNA配列である前記(4)から前記(7)のいずれか1項に記載の組換えDNAウイルスベクター、(9) 動物細胞で働く複製起点がウイルス由来又は動物細胞由来のものである前記(4)から前記(8)のいずれか1項に記載の組換えDNAウイルスベクター、(10) 動物細胞で働く複製起点がパポウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ボックスウイルス、及びパルボウイルス由来のものからなる群より選ばれるものである前記(9)記載の組換えDNAウイルスベクター、(11) プロモーターおよびポリAが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニフトリブーアクチンプロモーター、ウサギβグロブリンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)である前記(1)〜前記(10)のいずれか1項に記載の組換えDNAウイルスベクター、(12) プロモーター、リコンビナゼ遺伝子およびポリA配列を有する動物細胞感染用の組換えDNAウイルスベクター、並びに二つのリコンビナゼ認識配列及びその間に動物細胞で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列を有する動物細胞感染用の組換えDNAウイルスベクターを動物細胞に感染させ、二つのリコンビナゼ認識配列間に存する動物細胞で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列を環状分子として切り出し、細胞内で自律複製させることによる外来遺伝子の細胞内導入法、(13) DNAウイルスベクターがいずれもアデノウイルスベクターである前記(12)に記載の外来遺伝子の細胞内導入法、並びに(14) 遺伝子治療に際して、前記(12)又は(13)記載の細胞内導入法を用いることを特徴とするヒト遺伝子の細胞内導入法、に関する。

【0008】以下に本発明について詳細に説明する。本発明における動物細胞感染用のDNAウイルスベクターは、アデノウイルスのように細胞に感染後染色体でしか存在し得ないようなDNAウイルス由来のベクターであれば、特に制限されることなく用いることができる。例えば、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、パポウイルスベクター等が挙げられる。以下、リコンビナゼ遺伝子又はリコンビナゼ認識配列

50

5

をもつ動物細胞感染用のDNAウイルスベクターの好適な例として、アデノウイルスベクターを用いて本発明を説明する。

【0009】本発明に用いられるアデノウイルスは、動物を自然宿主とするものであり、特にヒトを宿主とするヒトアデノウイルスが好適に用いられる。ヒトアデノウイルスのゲノムは、約36kbpの2本鎖線状DNAであって、DNA鎖両端にはおよそ100bpからなる逆方向反復塩基配列があり、そのDNA鎖両端の5'末端にはE2B遺伝子産物が切断加工された55kのタンパク質が共有結合しているという特異な構造をしている。

【0010】本発明に用いられるアデノウイルスのゲノムは、E1領域特にE1A領域を欠失している。これは、アデノウイルスの細胞ガン化活性に関与するE1A領域を欠失させることにより、アデノウイルスを無毒化し、ゲノム中に組み込んだ外来の遺伝子配列のみを発現させるためである。必ずしもE1A領域の全てを欠失させる必要はなく、E1A領域、特に1.3-9.3%の断片を除去すれば、目的は達成される。また、本発明に用いられるアデノウイルスのゲノムは、E3領域も欠失させてもよい。特に、E3領域の7.9.6-8.4.8%を欠失させたものが好ましい。アデノウイルスの複製には不要であるからである。したがってE1A、E1B遺伝子を持続的に発現しているヒト胎児腎由来細胞株(293細胞)を除き、宿主細胞内で増殖することができないという特徴を有する。

【0011】本発明に用いられる組換えアデノウイルスベクター粒子は、上記の293細胞に接種すると野生株同様に $10^4 \sim 10^8$ p.f.u. (プラーク形成単位)/mlの感染力になるまで増殖する。しかし、他の細胞や動物組織に接種すると、このウイルス粒子は細胞内へ高率に侵入し、ウイルスゲノムが核内へ注入されるものの、E1A遺伝子が欠失しているため、この遺伝子産物により転写活性化される他のすべてのアデノウイルスプロモーターは働くことができない。一方、このアデノウイルスゲノム中に組み込まれた外来遺伝子は、ゲノムに組み込まれた外来のプロモーターから転写され発現することができる。従って、本発明に用いられる組換えアデノウイルス粒子を使用すれば、ベクターとしてのアデノウイルスゲノムの影響を最小限に抑えて、広範な動物細胞中で外来遺伝子が発現させることができる。

【0012】野生株のヒトアデノウイルスが感染後増殖できる細胞はほとんどヒト細胞に限られているにもかかわらず、本発明に用いられる組換えアデノウイルスで発現可能な細胞種・組織は、はるかに広い範囲にわたる。これは、本来のアデノウイルスが増殖できない細胞でも、本発明に用いられる組換えアデノウイルスの場合はウイルス粒子が感染・侵入さえできれば発現ベクターとして充分に機能し得るからである。

【0013】しかし、本発明に用いられる組換えアデノ

6

ウイルスのゲノムは、染色体外の状態では複製しないため、2週間～2ヶ月にわたって核内に存在するものの、長期間の目的遺伝子の発現が要求される場合には多数回の投与が必要となり、抗体の出現等の弊害が予想される。そこで、本発明では、かかる組換えアデノウイルス外来遺伝子として後述のリコンビナゼ遺伝子を組み込んだ新規組換えアデノウイルスを作製し、他方、このリコンビナゼの基質となる塩基配列(認識配列)2ヶ所に挟まれた目的の外来遺伝子を組み込んだ別の新規組換えアデノウイルスを作製し、これら両者を動物細胞に感染させ、リコンビナゼ遺伝子の発現により生ずるリコンビナゼの作用によって他方の組換えアデノウイルスを切断し、切り出された部分が環状分子となり、細胞内で自律複製できるように他方の組換えアデノウイルスを構築する。

【0014】本発明に用いられるプロモーターとしては、動物ウイルス遺伝子プロモーターおよび動物細胞遺伝子プロモーターが挙げられる。前者の例としてはSV40遺伝子プロモーター、アデノウイルス主要後期遺伝子プロモーター等があり、また、後者の例としては、チミジンキナーゼ遺伝子プロモーター、メタロチオニン遺伝子プロモーター、免疫グロブリン遺伝子プロモーター等がある。しかし本発明には、CAGプロモーターが特に有利に用いられる。このプロモーターは、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニトロβ-アクトチンプロモーター、ウサギβグロブリンのスプライシングアクセプターおよびウサギβグロブリン由来のポリA配列からなるハイブリッドプロモーターであり、高発現ベクターとして特開平3-168087号公報に開示されている。その開示は同公報に記載されているpCAGGS(特開平3-168087、13頁20行～20頁14行および22頁1行～25頁6行)から制限酵素SalI、HindIIIで切り出すことにより行うことができ、本発明に利用することができる。

【0015】本発明に用いられるリコンビナゼは、特異的なDNA組換え酵素で、特定の塩基配列を認識し、この配列間でDNAの切断、鎖の交換と結合の全工程を行う。かかる酵素としては、大腸菌のバクテリオファージP1がコードするもの(リコンビナゼCre)がある。これはバクテリオファージP1内のloxP(Abremskiら、J. Biol. Chem. 1984、159-1514; および Hoessら、P.N.A.S.、1984、81、1026-1029)配列を基質とする。即ち、loxP配列がリコンビナゼCreの認識配列となる。また、他のリコンビナゼとして酵母の2μプラスミド由来のFLP遺伝子がコードするリコンビナゼが挙げられる(James R. Broachら、Cell、29、227-234)。さらに、チゴサッカロマイセス・ルーイイのpSR1プラスミド由来のものも使用できる。これはR遺伝子にコードされる(Matsuzakiら、Molecular and Cellular Biology、8、955-962(1988))。これら

7

の中では、バクテリオファージP1のリコンビナーゼが本発明に特に好適である。

【0016】リコンビナーゼ遺伝子は、例えば、リコンビナーゼCre遺伝子の場合には、バクテリオファージP1のDNAのリコンビナーゼ遺伝子をコードする部分をポリメラーゼ・チェイン・リアクション(PCR)法を用いて増幅して本発明に使用することができる。その他のリコンビナーゼ遺伝子の場合も同様にPCR法を用いて調製することができる。この場合中使用するプライマーは、リコンビナーゼ遺伝子の全配列がカバーされるように選択され、さらに組換えアデノウイルスベクターの構築の便宜のため、各プライマーの外側に適当な制限酵素切断配列を付加したものを使用することが好ましい。

【0017】上記のリコンビナーゼの認識配列(基質となる配列)は数nbpであり、例えばIoxP配列は34bpであり、全て、塩基配列が知られているので(Abrenski, J. Biol. Chem. 1984, 1509-1514; および Hoess, P. N. A. S., 1984, 81, 1026-1029)、常法により化学合成して本発明に使用することができる。

【0018】本発明に用いられるポリA配列としては、特に限定されるものではないが、ウサギβグロビン由来のものが特に好ましい。

【0019】本発明においては、リコンビナーゼ遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込む場合に、同時に核移行シグナル配列を組み込むことが好ましい。これは、アデノウイルスベクターにより感染細胞の核内で発現されたリコンビナーゼが核外に分泌されるため、リコンビナーゼがその認識配列を有するアデノウイルスベクターに作用するには、再び核内に移行する必要があり、核移行シグナル配列はこれを促進する(Daniel Kalderon, Cell. 39, 499-509 (1984))からである。

【0020】本発明に用いられる動物細胞で働く複製起点としては、ウイルス由来のものおよび動物細胞由来のものが挙げられる。例えば、ウイルス由来のものとしてパポバウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ボックスウイルス又はバルボウイルス由来の複製起点が挙げられる。パポバウイルス由来のものとしてSV40由来の複製起点があげられる。これらの複製起点が本発明の組換えアデノウイルスベクターに組み込まれるのは、リコンビナーゼで切り出された環状分子が細胞内で自律複製できるようにするためである。

【0021】本発明に使用される外来遺伝子としては、上記のハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)あるいはその他のプロモーターにより発現することができる遺伝子であれば、特に限定されるものではなく、有用性の観点から、ヒトの欠損遺伝子に対応する正常遺伝子の配列(例えばアデノシチンデアミナーゼ、ジストロフィン、低密度リポ蛋白レセプター、α-1アンチトリプシン、血液凝固第8因子、血液凝固第9因子、ガラクトシダーゼα、もしくはβ)、サイトカイン類(例

8

えばインターロイキン-1~12、インターフェロンα、βもしくはγ、腫瘍壊死因子-αもしくはβ、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、成長ホルモン、インシュリン、インシュリン様成長ホルモン)、神経栄養因子類、非自己抗原遺伝子(例えばアロHLA(HLA-B7))、ウイルス抗原等をコードするヌクレオチド配列、ガン抑制遺伝子(例えばp53、RB、WT-1、NM23、NF-1)、ガン遺伝子であるRas等のアンチセンス配列、またはチミジinkinナーゼやシトシンデアミナーゼのような自殺遺伝子と呼ばれるものが挙げられる。

【0022】本発明の組換えアデノウイルスベクターに組み込まれる複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列は、二つのリコンビナーゼ認識配列の間にあって上流からこの順に配向しているのが通常である。しかし、外来遺伝子、ポリA配列、複製起点およびプロモーターが上流からこの順に配向していてもよい。環状分子になれば上記の配列と同一になるからである。

【0023】本発明を遺伝子治療に使用する場合は、リコンビナーゼを発現可能な本発明の組換えアデノウイルスベクターと二つのリコンビナーゼ認識配列の間に動物で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列を有する本発明の組換えアデノウイルスベクターとを共感染させることにより行う。感染は、同時でも、いずれかを先に感染させてもよい。感染により動物細胞内に注入されたDNAは、1か月以上安定に存在するからである。リコンビナーゼ発現可能な本発明の組換えアデノウイルスベクターは細胞内で一定期間発現を続け、リコンビナーゼが産生される。そして、このリコンビナーゼは、共感染させた他方の組換えアデノウイルスベクターすなわち二つのリコンビナーゼ認識配列を有する本発明の組換えアデノウイルスベクターに作用し、二つのリコンビナーゼ認識配列に挟まれた部分を切り出し環状分子化する。この環状分子には動物細胞で働く複製起点が組み込まれているので、細胞内で自律複製する。従って、1回の共感染により、治療効果をほぼ永続的に持続させることができる。このように、本発明の組換えアデノウイルスは、遺伝子治療に極めて有用性が高いと考えられる。このような動物細胞としては、ヒトまたは哺乳動物の高度に分化した神経系、筋系、肝細胞から未分化な上皮細胞、繊維芽細胞に至る広範囲の細胞が挙げられる。

【0024】次に、本発明の組換えアデノウイルスの製造方法について説明する。

(1) まず、プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えアデノウイルスベクターの製造方法について説明する。本発明の組換えアデノウイルスベクターの作成は、前述のとおりウイルスゲノムの両端にタンパク質が共有結合しているため、一般に極

めて困難である。そこで本発明においては、以下の方法を用いる。リコンビナゼ遺伝子としてリコンビナゼ Cre 遺伝子を使用した場合について述べるが、他のリコンビナゼ遺伝子の場合もほぼ同様である。

【0025】① PCR法で調製したリコンビナゼ Cre 遺伝子およびプラスミド pUC19 (宝酒造製) とをそれぞれ制限酵素 Pst I (宝酒造製) および Xba I (宝酒造製) で同時消化したのち混合・ライゲーションし、リコンビナゼ Cre 遺伝子が組み込まれたプラスミド pUCCre を得る。

② 細胞工学、13、760-763 (1994) に記載の方法により調製した CAG プロモーターを含むカセットコスミド pAdex1CAwt を制限酵素 Sma I (Boehringer 社製) で処理したもの、pUCCre を制限酵素 Pst I (宝酒造製) および Xba I (宝酒造製) で同時消化したもの、Klenow 酵素 (宝酒造製) で両端を平滑化したものとを混合する。ついでカセットコスミドを沈澱させ、T4 DNA リガーゼで結合させ、リコンビナゼ Cre 遺伝子を組み込んだカセットコスミドを得る。

【0026】CAG プロモーター以外のプロモーターを使用する場合は、まず、アデノウイルスゲノム (36 kb) の全長のうち、複製に不要な E3 領域 (1.9 kb) と E1A・E1B 領域 (2.9 kb) を欠失させた約 31 kb のゲノム DNA をつかセットコスミドを作成し、他方、使用しようとするプロモーター、リコンビナゼ Cre 遺伝子およびポリ A 配列を含むプラスミドを作成し、適当な制限酵素で処理してアデノウイルスゲノムの E1A・E1B 欠失部位にリコンビナゼ Cre 遺伝子発現ユニットを組み込んだカセットコスミドを得る。

③ 次に、得られたカセットコスミドを、ラムダ・インビトロ・パッケージングキットであるギガパック XL (Stratagene 社) を用いて、インビトロ・パッケージングを行う。

【0027】④ 一方、アデノウイルス DNA-蛋白複合体 (Ad5dlx DNA-TPC) を調製する。アデノウイルス DNA とは、Ad5dlx (I. Saito et al., J. Virology, vol. 54, 711-719 (1985)) を用い、Ad5dlx を HeLa 細胞 (Roux 10 本分) に感染させ、培養を行う。ウイルス粒子を回収し、塩酸 Guanidinium 処理・超遠心により DNA-TPC を分離・回収する。こうして得られた Ad5dlx DNA-TPC を次のステップの組換えアデノウイルス作製のため充分量の EcoT22I で処理する。

【0028】⑤ 最後のステップとして、リコンビナゼ Cre 遺伝子を組み込んだカセットコスミドと EcoT22I で処理した Ad5dlx DNA-TPC を混合し、セルフェクト (ファルマシア社製) キットを用いて、リン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。

ウイルスの増殖のため細胞が死滅したものからウイルス液を回収しプロモーター、リコンビナゼ遺伝子およびポリ A 配列を有する組換えアデノウイルスベクターを得る。

【0029】(2) 次に、二つのリコンビナゼ認識配列並びにその間に動物細胞で働く複製起点、プロモーター、外来遺伝子およびポリ A 配列を有する組換えアデノウイルスベクターの製造方法について述べる。便宜上、プロモーターおよびポリ A 配列としては前記の CAG プロモーターを、また複製起点として SV40 の複製起点を使用する場合について述べる。

【0030】(a) まず、目的の外来遺伝子を発現するカセットコスミドを作製する。

① CAG プロモーターを含むプラスミド pCAGGS (Niwa ら, Gene, 108, 193-200 (1990)) のクロン化部位に Sma I リンカーを挿入することにより得た pCAWG を Sma I で切断し、アルカリホスファターゼで処理する。ついで目的の外来遺伝子と pCAWG を混合し、リガーゼで処理し、大腸菌 DH1 株 (ATCC 33849) を形質転換し、CAG プロモーターの制御下に発現し得る方向に外来遺伝子が挿入されたプラスミドを得る。

【0031】② 次に、外来遺伝子の発現ユニット (CAG プロモーターの制御下に発現する方向に外来遺伝子が挿入されたもの) と SV40 の複製起点を含む DNA 断片を作製する。① で得られたプラスミドを制限酵素 Sma I および Sal I で同時消化し、さらに Klenow 酵素により両端を平滑化し、電気泳動により目的の DNA 断片を得る。これを、制限酵素 Sma I で切断したのちアルカリホスファターゼ処理した pUC18 (宝酒造製) と混合し、リガーゼで処理して外来遺伝子発現ユニットと SV40 の複製起点を組み込んだプラスミドを得る。

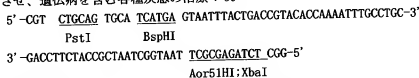
【0032】③ 次に発現ユニットと SV40 の複製起点を含む DNA 断片の両端に loxP 配列を付加するため以下の操作を行う。pUC119 (宝酒造製) を制限酵素 Ecl136I で切断し、アルカリホスファターゼ処理をした後、末端に Mlu I 部位および Xho I 部位を有し、これが連結すると Nru I 部位を生じるように設計されている loxP 配列を含む合成 DNA 断片 (配列番号: 3) とのリガーゼ反応に付し、この合成 DNA 断片が二つ挿入されたプラスミドを得る。このプラスミドを、制限酵素 Nru I で切断し、アルカリホスファターゼで処理した後、② で得られたプラスミドを制限酵素 Sma I および Ecl136I で同時消化し、平滑化して得られた DNA 断片とリガーゼにより結合して、外来遺伝子発現ユニットおよび SV40 の複製起点を含む DNA 断片の両端に loxP 部位を有する断片を含むプラスミドを得る。

【0033】④ 次に、外来遺伝子発現ユニットおよび

SV40の複製起点を含むDNA断片の両端に10xP部位を有する断片を含む組換えコスミドを得るため以下の操作を行う。まず、③で得られたプラスミドを制限酵素SmaIおよびEcoRIで同時消化し、両端をKlenow酵素で平滑化し、電気泳動により精製して、外来遺伝子発現ユニットおよびSV40の複製起点を含むDNA断片の両端に10xP部位を有する断片を用意する。一方、pAdex1cw(細胞工学、13、760-763(1994))を制限酵素SwaIで切断したものを用意する。これら両者を混合し、カセットコスミドを沈澱させ、T4 DNAリガーゼで結合させ、外来遺伝子発現ユニットおよびSV40の複製起点を含むDNA断片の両端に10xP部位を有する断片を組み込んだカセットコスミドを得る。

【0034】(b)二つの10xP配列およびその間に複製起点、CAGプロモーター、外来遺伝子を有する断片を組み込んだ組換えアデノウイルスベクターの作製さらに、上記(1)の⑤~⑥と同様な操作を行うことにより、SV40の複製起点、目的の外来遺伝子発現ユニットおよびその両端に10xP配列を有する本発明の組換えアデノウイルスベクターを作製することができる。

【0035】本発明の方法により上記のように得られる、プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する本発明の組換えアデノウイルスベクターおよびSV40の複製起点、目的の外来遺伝子発現ユニットおよびその両端に10xP配列を有する本発明の組換えアデノウイルスベクターの高力価ウイルス溶液は、適宜希釈して局所注入(中枢神経系・門脈など)、経口(腸溶剤を用いる)投与、経気道投与、経皮投与等の投与方法により共感染させ、遺伝病を含む各種疾患の治療*30



(下線部分は、制限酵素の認識部位である。)

【0038】PCR反応条件

緩衝液: 10mMのKCl、20mMのTris-HCl(pH8.8)、10mMの(NH₄)₂SO₄、20mMのMgSO₄、0.1%のTriton X-100(NEB社添付の緩衝液を使用)

耐熱性ポリメラーゼ: ユニット

dNTP: 400μM

プライマー: 1μM

P1ファージDNA: 1ng

2本鎖解離温度: 1.5分間

アニーリング温度: 1.5分間

伸長反応温度: 2.0分間

反応サイクル: 20回

【0039】この断片およびpUC19(宝酒造製)それぞれ制限酵素PstI(宝酒造製)およびXba

*に用いることができる。

【0036】

【実施例】以下、実施例、参考例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなから限定されるものではない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual. T. Maniatisら編、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行った。また、DNA制限酵素および修飾酵素は、宝酒造、New England Biolabs(NEB)社、Stratagene社又はBoehringer社から購入し、製造者指示書に従って使用した。

【0037】実施例1

<リコンビナーゼCre遺伝子およびCAGプロモーターを有する組換えアデノウイルスベクターの作製>

(1)リコンビナーゼCre遺伝子発現用カセットコスミドの作製

①リコンビナーゼCre遺伝子を含む大腸菌ファージP1DNA(ATCC11303-B23)をテンプレートとし、5'-プライマーとして下記の(配列番号:1)のオリゴヌクレオチドを、3'-プライマーとして下記の(配列番号:2)のオリゴヌクレオチドを、耐熱性ポリメラーゼとしてNEB社製のVent⁺を用い、以下の条件でPCR反応を行い、生成物をアガロースゲル電気泳動にかけ、約1kbのバンドを切り出し、リコンビナーゼCre遺伝子を含む約1kbのDNA断片を得た。

I(宝酒造製)により同時消化したのち、回収し、モル比が約3:1になるように混合し、T4DNAリガーゼ(宝酒造製)を用いてligation反応を行った。さらに、この反応混液を用いて大腸菌JM109株(ATCC53323)を形質転換した。アンピシリン(100μg/ml)を添加したLB寒天プレートから形質転換株を拾い、リコンビナーゼCre遺伝子を含むプラスミドpUCCreを得た。

【0040】次に、細胞工学、13、760~763(1994)に記載の方法により調製したCAGプロモーターを含むカセットコスミドpAdex1CAwtをSwaIで切断したもの1μgと、pUCCreをPstIおよびXbaIにより同時消化し、さらにKlenow酵素(宝酒造製)により両端を平滑化して得た約1kbの断片0.1μgとを混合した。ここに、CAGプロモーターとは、高発現ベクターとして特開平3-16

8087号公報に開示されているものであり、その調製は、同公報に記載されているpCAGGS(特開平3-168087、13頁20行~20頁14行および22頁1行~25頁6行)から制限酵素SalI、HindIIIで切り出すことにより行うことができ、本発明に利用することができる。

【0041】② 次に、混合液にエタノールを加えてコスミドを沈澱させた。沈澱物を遠心分離により取得し、10mMトリス塩酸(pH7.5)に1mMのEDTAを添加した溶液(TE)の5倍希釈液に溶解した。

③ 得られたコスミドをリガーゼ反応buffer中でATP、T4DNAリガーゼを加え、最終容量7μlで一晩結合させた。ついで滅菌水、SwaI反応bufferを加えて48μlとしてから70℃10分でリガーゼを熱失活させた。この際、プラズミドと異なり、コスミドでは、環状ではなく直鎖状タンデムに結合した巨大分子が効率よくパッケージされる。

【0042】④ 2μlのSwaI(Boehringer社製)を加え、25℃で1時間切断した。SwaI切断を行う意味は、カセットコスミドが発現ユニットをくわえ込むことなく再結合するとSwaI認識配列が再生されるため、このステップで発現ユニットの組み込まれていないコスミドを再切断し、コロニーを作らなくするためである。この方法はインサートをもつカセットコスミドだけを選択する強力な方法である。

⑤ 常法(Molecular Cloning vol.3 E.34)に従い、カセットコスミドのフェノール抽出、遠心分離、ついでゲル濾過を行った。

⑥ 再度、SwaI切断を行った。即ち、SwaI反応buffer中、5μlのSwaIを加え、25℃で2時間切断した。その理由は上記の通りである。

【0043】⑦ 得られたコスミドの1μlについてイン・ビトロ・パッケージングを行った。即ち、ラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキットであるギガバックXL(Stratagene社製)を1/4スケールで用い、残りは-80℃に凍結した。ギガバックXLは42kb以下のコスミドのパッケージ効率が低いのでインサートが入って大きくなったコスミドをある程度選択することができる。本実験では、10個のコロニーを拾えば大半はインサートを含んでおり、目的の向き(左向き)のクローンを容易に得ることができた。コスミドの扱い方については、常法(斎藤 泉他、実験医学:7:183-187, 1989)に従って行った。

【0044】⑧ パッケージングされたコスミドをDH1(ATCC33849)に感染させた。即ち、3枚のA p' (アンピシリン添加)寒天プレートと5mlのA p' LB(pool)にそれぞれ1/200量、1/200量、1/2量、残り全量を接種し、一晩培養した。poolのminiprepDNAを抽出・調製し、全酵素切断によりインサートが入ったものの割合を調べた。

コロニーは丸ごと寒天ごと取り1.5mlのA p' LBで、一晩培養し、miniprepDNAを調製した。

⑨ 次に、制限酵素切断により、発現ユニットの向きと構造を確認した。なお、NruIとリガーゼを用いて、発現単位を含むが大部分のアデノウイルスDNAを欠失したプラスミドを作製し、DNAを調製して、cDNAクローン化の最終確認をした。

【0045】(2) アデノウイルスDNA-蛋白複合体(Ad5 d1X DNA-TPC)の調製

① アデノウイルスDNAとしては、Ad5 d1X(I. Saito et al., J. Virology, vol.54, 711-719 (1985))を用いた。Ad5 d1XをHeLa細胞(Roux 10本分)に感染させ、培養を行った。即ち、Ad5-d1Xのウイルス液(〜10⁷ PFU/ml)を0.2ml/Roux感染させ、3日後に、はがれた細胞を1500rpm、5分にて遠心分離して集めた。アデノウイルス粒子のほとんどはメディウム中ではなく細胞の核内にいるので感染細胞からウイルスを精製できる利点がある。(以下の操作は非無菌的に行った。)

② 得られた細胞を10mMのTris-HCl(pH8.0)の20mlに懸濁し、密封型ソニケーターを用い、200W、2分(30秒×4)で細胞を破砕し、ウイルスを細胞内から放出させた。ウイルスを細胞内から放出させるには5ml以下なら凍結融解5回でもよいが、それ以上の容量ではソニケーターが便利である。ただし、必ず密封型(専用カップのあるもの)を用いる。通常の投げ込み型は、たとえ安全キャビネットの中でも危険性がある。

③ 得られた破砕物を遠心分離(10krpm、10分)により沈澱を除いた後、超遠心機SW28チューブに15mlの塩化セシウム溶液(比重1.43)を入れ、その上に上清を重層し、クッション遠心(25krpm、1時間、4℃)による濃縮を行った。

④ 界面直下のウイルス層をSW50.1チューブに移した。界面直下のウイルス層は通常目視でき、ウイルス層とその下層の塩化セシウムを5ml採取した。同時にもう一本に塩化セシウム溶液(比重1.34)を満たした。これらを、35krpm、4℃で一晩超遠心に分けた。次いで、白いウイルスのバンドを分取し、既に勾配ができたチューブに乗せ替えた。さらに、35krpm、4℃4時間以上超遠心に分けた。

⑤ 白いウイルスのバンドを分取し、等量の8M塩化グアニジンと室温で混合し、4M塩化グアニジン飽和塩化セシウムを加えてVTi65チューブに満たした。4M塩化グアニジンにより、粒子蛋白は変性を受けて解離し、DNA-TPCが放出された。エチジウムブロミドは後で除く方法が確立されていないため利用できなかった。

⑥ 上記のチューブを、55krpm、150 5℃で一晩超遠心にかけ、0.2mlずつ分画し、その

1 μ l ずつを1 μ g/mlのエチジウムブロミド水溶液20 μ lと混合し、蛍光染色することによりDNAの有無を確認した。DNAを含む2〜3フラクションを集めた。

⑦ 500mlのTEに一晚透析(2回)し、-80℃に保存した。こうして得られたAd5dlX DNA-TPCの量をOD₂₆₀から通常のDNAと同様に算出した。

⑧ 得られたAd5dlX DNA-TPCを、第3ステップの組換えアデノウイルス作成のため、充分量のEcoT22Iで2時間切断した後、-80℃に保存した。

【0050】なお、DNA-TPCは制限酵素による切断、透析、ゲル濾過はできるが電気泳動・フェノール処理・エタノール沈澱はできなかった。濃縮法は塩化セシウム平衡遠心しかないのなるべく濃厚状態に保った。10Rouxの感染細胞から約300 μ g程度のDNA-TPCを得ることができた。

⑨ 一部を分取し、泳動用BPB bufferを10 μ l加えた後に、1 μ lのプロテイナーゼK(10mg/ml)を加えて37℃で10分間反応させて末端蛋白を消化した。フェノール抽出し、上清をアガロースゲル電気泳動で分離し、完全切断を確認した。EcoT22I切断DNA-TPC中の制限酵素bufferを、遠心ゲル濾過によって除いた後、分注し-80℃に保存した。

【0051】(3) 組換えウイルスの分離と高力価ウイルス液の作製

① 10%FCS添加DMEで培養した293細胞の6cm、10cmシャーレ各1枚用意した。

② 発現ユニットを組み込んだpAdex1w DNAの8 μ g(3〜9 μ gが適当である)とEcoT22Iで切断したAd5dlX DNA-TPCの1 μ gを混合し、セルフェクト(ファルマシア社製)キットを用いて、6cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行った。6cmシャーレのメディアムの上から混合液を滴下し、培養を続けた。一晚培養(約16時間)し、午前中に培養液を交換し、夕方、コラゲンコート96穴3枚(原液・10倍希釈・100倍希釈)に、5%FCS添加DMEを用い、各ウェル当たり0.1mlでまき直した。細胞数が各プレートで大きく変わらないように、希釈2枚分には10cmシャーレの293細胞を1/3ずつ混ぜて播いた。

【0052】③ 3〜4日後と8〜10日後に、各ウェルに50 μ lの10%FCS添加DMEを加えた。293細胞がやせてきたら早めに加えた。ウイルスが増殖し細胞が死滅したウェルが7〜15日の間に現れた。ウェルの細胞が完全に死滅するごとに減菌バスツールベットの培養液(死細胞ごと)を減菌した1.5mlチューブに無菌的に移して、ドライアイスで急凍して-80℃

に保存した。

④ 15〜18日で判定は終了した。比較的速く細胞が死んだウェルから回収した培養液チューブを約10個選り、凍結融解6回後、5krpm10分遠心して得られた上清を1次ウイルス液(first seed)として-80℃に保存した。早めにウイルス増殖が起こったウェルは複数のウイルス株の混合感染の可能性が高いからである。

【0053】⑤ 24穴プレートに293細胞を用意し、5%FCS-DME(0.4ml/ウェル)と1次ウイルス液10 μ lをそれぞれ2ウェルずつ添加した。

⑥ 約3日で細胞が完全に死滅したら、1ウェルは1次ウイルス液作製と同様に6回の凍結融解と遠心で上清を得、これを2次ウイルス液(second seed)として-80℃に保存した。2次ウイルス液の力価は10⁷〜10⁸PFU/ml程度であった。他の1ウェルの死滅した細胞を5krpmで5分間遠心し、上清を捨てて細胞だけを-80℃に保存した(セルバック)。10種類のウイルス株のセルバックが集まったら以下の方法で感染細胞の全DNAを抽出した。セルバックには、400 μ lのcell DNA用TE(50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mMEDTA)、4 μ lのproteinaseK(10mg/ml)および4 μ lの10%SDSを加えた。

【0054】⑦ 50℃で1時間処理した後、フェノール・クロロホルム抽出2回、クロロホルム抽出2回、ついでエタノール沈澱により得られた核酸をRNaseを20 μ g/ml含む50 μ lのTEに溶かした。その15 μ lを発現ユニットを切断する酵素の中で認識配列にCGを含む酵素であるXhoIで切断し、発現コスミドカセットのXhoI切断と共に、15cm位の長さのアガロースゲルで一晚電気泳動を行い、パターンを比較した。発現ユニット内の切断点からアデノウイルスゲノムの左端までのバンドが正確に出現しているものを選択した。また、説明できないバンドが薄く見えるクロンは、欠失のあるウイルスとの混合の可能性があるので廃棄した。アデノウイルスDNAは細胞あたり10,000コピーに増殖するので、細胞DNAと一緒に全DNAを抽出し制限酵素切断によりウイルスDNAのバンドをみることができる。XhoIなどのように認識配列にCGを含む酵素は、細胞DNAを切断しないので、パターンが見やすい。これ以外の酵素を用いるときは、非感染293細胞DNAをコントロールにおくことが必要であった。(ヒト細胞の反復配列由来のバンドが出現した)。

【0055】⑧ XhoI切断で同定された目的のウイルス株の2次ウイルス液の0.1mlを、コラゲンコートした150cm²ボトル(培地は25ml)の293細胞へ感染させた。3日後に細胞が死滅したら、死細胞ごと25mlの培地を無菌的に密閉型ソニケータ200w最高出力2分(30秒×4回)で破砕してウイルスを遊離させた。3krpm、4℃で10分間遠心して

沈澱を除去し、5ml凍結用チューブに2mlずつ13本に分注し、ドライアイスで急速して-80℃に保存し、3次ウイルス液を調製した。3次ウイルス液は本発明の組換えアデノウイルスを含む液であり、 10^5 PFU/ml程度の高力価のものであった。なお、3次ウイルス液5 μ lを24穴プレートの293細胞1ウェルに感染し、増殖したウイルスDNAの酵素切断パターンを上記の方法で確認した。もし、欠失ウイルスあるいは親ウイルスとの混合物であることが疑われたら、2次ウイルス液の段階で既にわずかに混在していた欠失ウイルスが増殖が早いめえてきた可能性があるため、全ての3次シードを廃棄して、別の2次ウイルス液から改めてやり直すが、その1次ウイルス液から限界希釈法により、目的のウイルスを純化した。

【0056】 参考例

<本発明の組換えアデノウイルスの簡便力価測定法>本発明の組換えアデノウイルスは、以下の方法により、簡便に測定することができる。

① 293細胞を10cmシャーレ各1枚用意する。組換えアデノウイルス液(3次ウイルス液)を5% FCS添加DMEを用いて 10^{-1} ~ 10^{-6} まで段階希釈する。例えば0.9ml DME+0.1mlウイルス液。チップをすべて替える。

② コーゲンコート96穴各1枚のすべてのウェルに50 μ lずつ5% FCS添加DMEを入れる。第1列目に、 10^{-1} に希釈した組換えウイルスを25 μ lずつ加える。8ウェル用マルチチャンネルピペットを用いて25 μ lを2列目のウェルに移す。以下同じ操作を11列目まで繰り返し最後の25 μ lを捨てる。結果として3 \times の段階希釈列を $3^1 \times 10^{-6}$ まで作製することができる。12列目は非感染細胞のコントロールとする。この時を用いるチップはその度に替える。

【0057】 実施例2

<二つのloxP配列、並びにその間にSV40の複製起点、CAGプロモーター、およびB型肝炎ウイルス表面抗原(HBs)を有する組換えアデノウイルスベクターの作製>

(1) B型肝炎ウイルス表面抗原(HBs)発現用カセットコスミドの作製

5'-CGAACGCGTATAACTTCGTATAGCATACATTATCTCTCGAGTCG-3'

3'-GCTTGGCGCATATTGAAGCATCTCGTATGTGAATATGCTTCAATAGAGCTCAGC-5'

(下線部分の配列がloxP部位である。)

上記の③で得られたpUC18CAHBsSを制限酵素SmaIおよびEclI36IIで同時消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動により3.6kbの断片を回収した。pUL2rを制限酵素NruIで切断しアルカリホスファターゼ処理を施した後、3.6kb断片とのligation反応を行い目的とするプラスミドpULCA・HBsSを得た。

*① HBs cDNAを含むプラスミドpHBVadr4(Fujiyama et. al., Nucleic Acids Res., 11, 4601-4610, 1983)を制限酵素PspI406IおよびXhoIで同時消化した後、さらにKlenow酵素により両端を平滑化し、アガロースゲル電気泳動により710bpの断片を回収した。

【0058】② CAGプロモーターの制御下でHBs cDNAを発現させるための発現ユニットを得るために以下の操作を行った。CAGプロモーターを含むプラスミドpCAGGS(Niwa et. al. Gene, Vol.108, P193-200)のクロニン化部位にSwaIリンカーを挿入することにより得たpCAGGSをSwaIで切断しアルカリホスファターゼ処理を施した。次に、これとIで得た断片をモル比約1:3で混合したDNAリガーゼ反応を行い、反応混液により大腸菌DH1株(ATCC33849)を形質転換した。アンピシリンを添加したLB寒天プレートから形質転換体を拾い、CAGプロモーターの制御下でHBs cDNAが発現する方向に断片が挿入されたプラスミドpCAG・HBsを得た。

【0059】③ HBs発現ユニットおよびSV40の複製起点を含むDNA断片を得るために、以下の操作を行った。pCAG・HBsを制限酵素SapIおよびSmaIで同時消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動により3.6kbの断片を回収した。制限酵素SmaIで切断した後アルカリホスファターゼ処理を施したpUC18(宝酒造製)と3.6kb断片をモル比約1:3で混合しligation反応を行い、目的とするプラスミドpUC18CAHBsSを得た。

【0060】④ 次にHBs発現ユニットおよびSV40の複製起点を含むDNA断片の両端にloxP部位を付加するため以下の操作を行った。pUC119(宝酒造製)を制限酵素EclI36IIで切断し、アルカリホスファターゼ処理を施した後、末端にMluI部位およびXhoI部位を有しこれが連結するとNruI部位を生じるように設計されているloxP配列を含む下記の合成DNA断片(配列番号:3)とのligation反応を行い該合成DNA断片が2つ挿入されたプラスミドpUL2rを得た。

5'-CGAACGCGTATAACTTCGTATAGCATACATTATCTCTCGAGTCG-3'

3'-GCTTGGCGCATATTGAAGCATCTCGTATGTGAATATGCTTCAATAGAGCTCAGC-5'

【0061】⑤ HBs発現ユニットおよびSV40の複製起点を含むDNA断片の両端にloxP部位を有する断片を含む組換えコスミドを得るため次の両DNAを調製した。

(a) pULCA・HBsSを制限酵素SmaIおよびEcoRIで同時消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動により回収した3.7kbの断片0.3 μ g。

(b) 制限酵素SwaIで切断したpAdexlcw

(細胞工学、13、760-763、(1994)) 1
μg。

両者を混合し、実施例1の(1)②~④と全く同様の操作により目的とする組換えコスミドを得た。さらに実施例1の(2)~(3)と同様な操作により、目的の、二つのloxP配列、並びにその間にSV40の複製起点、CAGプロモーター、およびB型肝炎ウイルス表面抗原(HBs)を有する組換えアデノウイルスベクターAdex1LCAHBsSLを得た。

【0062】実施例3 (感染実験)

COS-1細胞またはCV-1細胞を、6cmシャーレのほぼ底面を覆う程になるまで培養する。実施例1および実施例2で得られたアデノウイルスベクターのそれぞれを、m.o.i.=5で下記のプレートに従って1時間吸着させた。3日後にハーベスとしてサザン解析した。即ち、組換えアデノウイルスベクターAdex1LCAHBsSLは、約6.0kbのHindIII切断部位を有し、また、リコンビナーゼCreによりloxP部位で切断されると3.5kbの環状分子となる。この環状分子はHindIII切断部位を1箇所有するので、感染後ハーベスしたDNAをHindIIIで処理して、電位泳動にかけ、サザンプロットを行った。プローブは、HBsフラグメント(710bp)を用いた。その結果を図1に示す。

【0063】図1から明らかなように、実施例1および実施例2で得られたアデノウイルスベクターの組み合わせで感染させた場合のみ、環状分子のHindIII切断により生じる3.5kbの環状DNAが観察された。

(レーン4およびレーン8)。また、実施例2で得られたアデノウイルスベクターとリコンビナーゼCre遺伝子を持つしないアデノウイルスベクターとを感染させた場合(レーン3およびレーン7)は、3.5kbのバンドは認められず、Adex1LCAHBsSLからHindIIIによって切り出されて生ずる6.0kbのバンドのみが認められる。

【0064】さらに、レーン7とレーン8のバンドの濃度の比較から、環状分子がCOS-1細胞内で約40倍に複製されたことが分かる。一方、レーン3とレーン4のバンドの濃度がほぼ同程度であることから、CV-1細胞内では、環状分子は複製されないことが分かる。これは、SV40由来の複製起点がCV-1細胞内では働かない事実と合致する。以上の結果は、実施例1および実施例2で得られた本発明のアデノウイルスベクターの*

配列

CGTCTGCAGT GCATCATGAG TAATTTACTG ACGGTACACC AAAATTGGC TGC 53

【0068】配列番号：2

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 組み合わせを用いて動物細胞に感染させることにより、二つのリコンビナーゼ認識配列に挟まれた部分が細胞内で切り出され、環状分子を形成し、かつ細胞内で自律複製することを明らかに証拠づけるものである。

【0065】なお、上記の感染実験は以下のように行うのが便宜である。培地の血清がFCSでない場合(例えばCS)は、培養細胞を無血清の培地で2度洗い培地で希釈を、以下の操作中に細胞面が乾いてしまわない程度に加える。96穴で30~40μl、24穴で50~70μl、10cmシャーレで100~200μlくらいであるが、ウイルス液を加える前の培地を意図的に少し残しておき、ウイルス液を加えて、この程度の容量にする方が实际的である。プレートを数回、シーソーのように数秒周期で振ることにより、ウイルス液を細胞にまんべんなくいきわたらせる。この操作を20分ごとに3回行う。この間、細胞はCO₂インキュベートにおく。3回目の操作が終わった後に(感染1時間後)、培養液を通常量加えて、通常のように培養する。感染時間は通常1時間、長くても2時間程度で充分である。

【0066】

【発明の効果】本発明により、広範な動物細胞において自律複製可能な形で外来遺伝子を動物細胞に導入することのできる組換えDNAウイルスベクターを提供することができる。また、本発明はこの組換えDNAウイルスベクターの簡易な製造方法を提供する。特に、本発明の組換えアデノウイルスベクターは遺伝病の治療に有用である。

【0067】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：53

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(一部Genomic DNAを含む任意のDNA)

ハイボセティカル配列：YES

アンチセンス：NO

起源：大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

特徴を決定した方法：S

50 起源：大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

* * 特徴を決定した方法: S

配列

GGCTCTAGAG CGCTTAATGG CTAATCGCCA TCTTCAG

38

【0069】配列番号: 3

※DNA)

配列の長さ: 52

ハイボセディカル配列: YES

配列の型: 核酸

アンチセンス: NO

鎖の数: 二本鎖

起源: 大腸菌ファージP1 DNA

トポロジー: 直鎖状

配列の特徴

配列の種類: 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の※

特徴を決定した方法: S

配列

CGAAGCGTA TAATTCGTA TAGCATACAT TATACGAAGT TATCTCGAGT GG

52

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、各種の組換えアデノウイルスベクターの組み合わせを用いてCOS-1細胞またはCV-1細胞に感染させた後回収されたDNAをHindIIIで処理し、電気泳動により分離し、サザンブロットで解析した結果を示す図である。

【符号の説明】

M マーカー

1 CV-1細胞に、培地のみを添加した対象区

2 CV-1細胞に、E3、E1A、E1B領域を欠失させ、外来遺伝子を組み込んでいないアデノウイルスベクターと実施例1で調製したリコンビナゼCre遺伝子とCAGプロモーターとを組み込んだ組換えアデノウ★

20

★イルスベクターとを感染させた区

3 CV-1細胞に、Adex1LCAHBsSL (実施例2で調製したもの)とE3、E1A、E1B領域を欠失させ、外来遺伝子を組み込んでいないアデノウイルスベクターとを感染させた区

4 CV-1細胞に、Adex1LCAHBsSL (実施例2で調製したもの)と実施例1で調製したリコンビナゼCre遺伝子とCAGプロモーターとを組み込んだ組換えアデノウイルスベクターとを感染させた区

5 COS-1細胞に、1と同様な処理を施した区

6 COS-1細胞に、2と同様な処理を施した区

7 COS-1細胞に、3と同様な処理を施した区

8 COS-1細胞に、4と同様な処理を施した区

【図1】

